



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

FRANCIELLY FIALHO LEAL

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)**

BRASÍLIA, 2019

FRANCIELLY FIALHO LEAL

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto

BRASÍLIA, 2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L L435a Leal, Francielly Fialho
ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.) /
Francielly Fialho Leal; orientador Izabel Cristina
Rodrigues da Silva; co-orientador Livia Cristina Lira de Sá
Barreto. -- Brasília, 2019.
28 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. óleo de buriti. 2. viabilidade celular. 3.
antimicrobiano. I. Silva, Izabel Cristina Rodrigues da,
orient. II. Barreto, Livia Cristina Lira de Sá, co-orient.
III. Título.

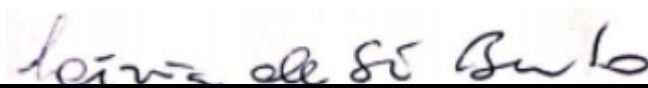
FRANCIELY FIALHO LEAL

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
EMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)**


BANCA EXAMINADORA



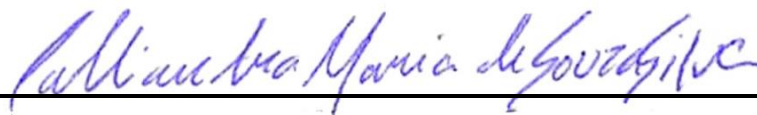
Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



Co-orientadora: Profa. Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



Luana Maria Magalhães de Souza Brandão
(Universidade de Brasília – Faculdade de Planaltina – FUP/UnB)



Calliandra Maria de Souza Silva
(Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular)

BRASÍLIA, 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, principalmente aos meus pais, pela paciência e apoio ao longo desses anos de Universidade. Todos os obstáculos e lutas que enfrentaram ao sair de uma pequena cidade do interior de Minas Gerais para criar seus dois filhos na capital do Brasil me levaram ao caminho que estou seguindo hoje. Este trabalho só está sendo possível graças a vocês.

À minha orientadora, professora Izabel, por ter me acolhido como sua orientanda e pelos ensinamentos a mim passados, pelas oportunidades que me proporcionou, por toda a paciência neste longo período de trabalho e por sempre acreditar em mim.

À minha co-orientadora, professora Livia, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, por me acolher como aluna de iniciação científica e de extensão e me dar a oportunidade de desenvolver projetos incríveis na universidade.

Ao professor Daniel, da Faculdade LS, por todo auxílio para realizar os experimentos que deram origem a esse trabalho. Aos meus companheiros de trabalho no laboratório, por toda a ajuda nos momentos que mais precisei.

Aos professores que me acompanharam ao longo dessa extensa jornada, transmitindo conhecimento e ensinamentos que me levaram a um caminho de amadurecimento e autoconhecimento, tanto como acadêmica, quanto como profissional. Agradeço à professora Claure, pela oportunidade de me inserir na iniciação científica e me ajudar a começar a trilhar um caminho na pesquisa.

Aos meus amigos de jornada na universidade, por todos os momentos que passamos juntos. Por cada viagem, saídas, conversas, risadas e apoio nos momentos mais difíceis. Vocês foram uma parte essencial para que eu pudesse enfrentar todos os desafios da universidade e chegar até aqui. Juntos somos mais fortes!

Ao meu amigo Mauro, por todos os anos de amizade, e por todo auxílio que me ofereceu para que este trabalho pudesse ser concluído.

À Universidade de Brasília, por ter me oferecido a oportunidade de viver essa incrível experiência que foi a graduação. Todos os momentos que vivi dentro da universidade me transformaram na pessoa e na profissional que estou me tornando hoje. Muito obrigada!

Agradeço também à FAP/DF pelo financiamento deste estudo.

“Viver é melhor que sonhar...”

Belchior

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Desenho do desenvolvimento de emulsão contendo óleo de Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> L.)..... | 12 |
| Tabela 2: Comparação dos componentes das duas formulações testadas..... | 13 |
| Tabela 3: Viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat. | 18 |
| Tabela 4: Concentração inibitória mínima, intervalo de confiança e concentração bactericida mínima dos materiais testados..... | 19 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: (A) Buriti. (B) Fruto do Buriti. | 3 |
| Figura 2: Principais classes de antibióticos. | 5 |
| Figura 3: Exemplos de quimioterápicos. | 6 |
| Figura 4: Redução do MTT a formazan..... | 10 |
| Figura 5: Amostra da formulação produzida contendo 5% de óleo de buriti e sem a adição de clorexidina..... | 14 |
| Figura 6: Método de microdiluição em caldo utilizando creme com óleo de buriti e clorexidina frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> | 17 |

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

IE – endocardite infecciosa

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

ATCC - *American Type Culture Collection*

CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CIM – concentração inibitória mínima

CBM - concentração bactericida mínima

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

m – metro

mm – milímetro

UVA – radiação ultravioleta do tipo A

UVB – radiação ultravioleta do tipo B

OMS – Organização Mundial da Saúde

NRU – Captação do Corante Vermelho Neutro

SIRC CCL 60 – linhagem celular da córnea de coelho;

FCE – Faculdade de Ceilândia

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

C – celsius

BHT – hidroxitolueno butilado

CMC – carboximetilcelulose

HaCat – linhagem celular de queratinócitos de origem humana;

EUA – Estados Unidos da América

DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco

SFB – soro fetal bovino

PBS – tampão fosfato-salino

g – aceleração

mL – mililitros

mg – miligramas

μL – microlitros

DMSO – dimetilsulfóxido

nm – nanômetros

IC50 – concentração necessária para inibir 50% do crescimento microbiano

IC 95 – intervalo de confiança

IC 99,9 – concentração bactericida mínima

MH – Mueller-Hinton

UFC – unidades formadoras de colônias

abs – absorvância

D.O. – densidade óptica

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

NCI – *National Cancer Institute*

h - horas

RESUMO

O Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) é uma palmeira pertencente à família *Arecaceae* e que está amplamente distribuída em toda a América do Sul. Do seu fruto, pode ser extraído o óleo fixo, que possui, em sua composição, diversos minerais, carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico, compostos fenólicos, ácidos graxos monoinsaturados e fitosteróis. Estudos recentes demonstraram que o óleo de buriti possui propriedades antioxidantes, fotoprotetoras contra radiações UVA e UVB, antitrombóticas e atividade antimicrobiana *in vitro*. Portanto, a alta concentração de substâncias bioativas em sua composição o torna um promissor objeto de estudo de suas propriedades farmacológicas. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades antimicrobianas de uma formulação cosmética contendo óleo de buriti, por meio do método de microdiluição em caldo, frente à bactéria *Staphylococcus aureus*. Além disso, antes de disponibilizar um produto cosmético para uso clínico, é preciso avaliar a capacidade do produto em induzir reações adversas, como irritação na pele. Para tanto, também foi realizado um estudo do potencial citotóxico da formulação, através do teste de ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT, frente à linhagem de células queratinócitas de origem humana (HaCat). Os dados foram analisados por ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal, em um nível de significância de 5%. Os resultados deste estudo demonstraram que a formulação produzida não possui atividade citotóxica frente à linhagem de células analisada, e apresentou inibição do crescimento da bactéria testada, sendo que o CIM das diferentes formulações do creme contendo óleo de buriti não foram superiores a 0,05%, sendo considerado um potencial antimicrobiano, e eletivo para testes em seres humanos

Palavras-chave: óleo de buriti; viabilidade celular; antimicrobiano

ABSTRACT

Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) is a palm tree that belongs to the *Arecaceae* family and it is widely distributed throughout South America. From its fruit can be extracted the fixed oil, which has in its composition several minerals, carotenoids, tocopherols, ascorbic acid, phenolic compounds, monounsaturated fatty acids and phytosterols. Recent studies have shown that buriti oil has antioxidant and antithrombotic properties, it is photoprotective against UVA and UVB radiation and it has antimicrobial *in vitro* activity. Therefore, the high concentration of bioactive substances in its composition makes it a promising object of study of their pharmacological properties. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial properties of a cosmetic formulation containing buriti oil, using the broth microdilution method against the bacteria *Staphylococcus aureus*. In addition, before making a cosmetic product available for clinical use, the product's ability to induce adverse reactions, such as skin irritation, must be assessed. To this end, a study of the cytotoxic potential of the formulation was also performed through the MTT reduction cell viability assay against the human keratinocyte cell line (HaCat). Data were analyzed by adjustment to the response-sigmoidal dose curve at a significance level of 5%. The results of this study have shown that the formulation produced has no cytotoxic activity against the cell line analyzed. Furthermore, it inhibited the growth of the tested bacteria, and the MIC of the different formulations of buriti oil containing the formulation were not higher than 0.05%, being considered a potential antimicrobial, and elective for tests in humans.

Keywords: buriti oil; cell viability; antimicrobial

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| 2.1 Buriti | 2 |
| 2.2 Antimicrobianos | 3 |
| 2.3 Antibióticos x antimicrobianos x antibacterianos | 4 |
| 2.4 Extratos de plantas que possuem atividade antimicrobiana | 6 |
| 2.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos – Microdiluição em caldo | 8 |
| 2.6 Ensaio de viabilidade celular | 9 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 11 |
| 4. OBJETIVOS | 11 |
| 4.1 Objetivo geral | 11 |
| 4.2 Objetivos específicos | 11 |
| 5. METODOLOGIA | 12 |
| 5.1 Elaboração da emulsão contendo óleo de buriti | 12 |
| 5.2 Ensaio de viabilidade celular | 14 |
| 5.2.1 Material biológico | 14 |
| 5.2.2 Tratamento e Ensaio de Viabilidade Celular | 15 |
| 5.2.3 Análise estatística | 15 |
| 5.3 Teste de microdiluição em caldo | 16 |
| 5.3.1 Análise estatística | 16 |
| 6. RESULTADOS | 17 |
| 6.1 Ensaio de viabilidade celular | 17 |
| 6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo | 18 |
| 7. DISCUSSÃO | 20 |
| 7.1 Ensaio de viabilidade celular | 20 |
| 7. 2 Teste de microdiluição em caldo | 21 |
| 8. CONCLUSÃO | 24 |
| 9. REFERÊNCIAS | 24 |

1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antimicrobianos representa um marco na medicina moderna. Até o início do século 20, doenças infecciosas eram consideradas as principais causas de morte na população em geral (ZAFFIRI et al., 2012). Em 1930, houve um grande avanço no tratamento de infecções com o desenvolvimento das sulfonamidas e, uma década depois, da penicilina. (TAVARES, et al., 2011).

Porém, a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos disponíveis no mercado tem se mostrado um fator preocupante. Devido ao uso irracional e indiscriminado de antimicrobianos, as bactérias desenvolveram mecanismos para impedir a ação destas drogas, tais como: modificação do sítio receptor; produção de enzimas que degradam ou mudam a estrutura do antimicrobiano, dentre outros (MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, et al., 2018).

Como exemplo, a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* é um patógeno humano que pode causar várias doenças, desde infecções de pele a bacteremia, endocardite infecciosa (IE) e sepse. Dentre as infecções nosocomiais, aquelas adquiridas em ambiente hospitalar, o *S. aureus* é o microrganismo que está associado a maior morbidade e mortalidade (LIPINSKA et al., 2011; OTTO, 2014).

Para contornar o problema, foi criado o beta-lactâmico sintético meticilina, que era resistente à ação das beta-lactamases produzidas pelo *Staphylococcus aureus* como mecanismo de resistência. Entretanto, logo após o advento da meticilina, surgiram relatos de amostras resistentes também a esse antimicrobiano, além da expressão de multirresistência. Essas cepas foram denominadas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (GELATTI et al., 2009).

Considerando esses fatores, é preciso buscar alternativas de tratamento aos antimicrobianos utilizados na clínica hoje. Para tanto, extratos vegetais têm sido bastante explorados em relação ao seu potencial antimicrobiano, ou na sua capacidade de potencializar o efeito de drogas existentes hoje no mercado, possuindo inúmeras vantagens, tais como: menor toxicidade e a combinação de várias substâncias, que juntas podem gerar diversos benefícios à saúde humana (EMEKA, 2015; MIKLASIŃSKA-MAJDANIK et al., 2018).

Dentre estas promissoras novas alternativas, encontra-se o buriti, que é uma palmeira amplamente distribuída na América do Sul, ocupando principalmente grande

parte da Amazônia, Cerrado e nordeste do Pantanal (KOOLEN et al., 2018). A partir do seu fruto, pode ser obtido o óleo fixo, rico em carotenóides, ácidos graxos, tocoferóis, compostos fenólicos, dentre outras substâncias bioativas (AQUINO et al., 2012). Suas propriedades o tornam uma promissora alternativa na busca de novos tratamentos farmacológicos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi executar a avaliação da atividade antimicrobiana de uma formulação cosmética contendo óleo de buriti, em bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Além disso, para o desenvolvimento de novas formulações tópicas, deve-se analisar se a formulação poderia induzir efeitos indesejáveis, como irritação da pele (TOLOSA et al., 2015). Para tanto, também foi realizado um estudo para avaliar a o potencial citotóxico da formulação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Buriti

O buriti (*Mauritia flexuosa* L.), também conhecido por outros nomes como miriti, muriti, palmeira-do-brejo, moriche, carangucha e aguaje é uma palmeira que pode alcançar 40m de altura, pertencente à família *Arecaceae* e que está amplamente distribuída em toda a América do Sul, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil, ocupando exclusivamente áreas que possuem solos hidromórficos, ou seja, solos que em condições naturais se encontram saturados por água (BATISTA et al., 2011; KOOLEN et al., 2018).

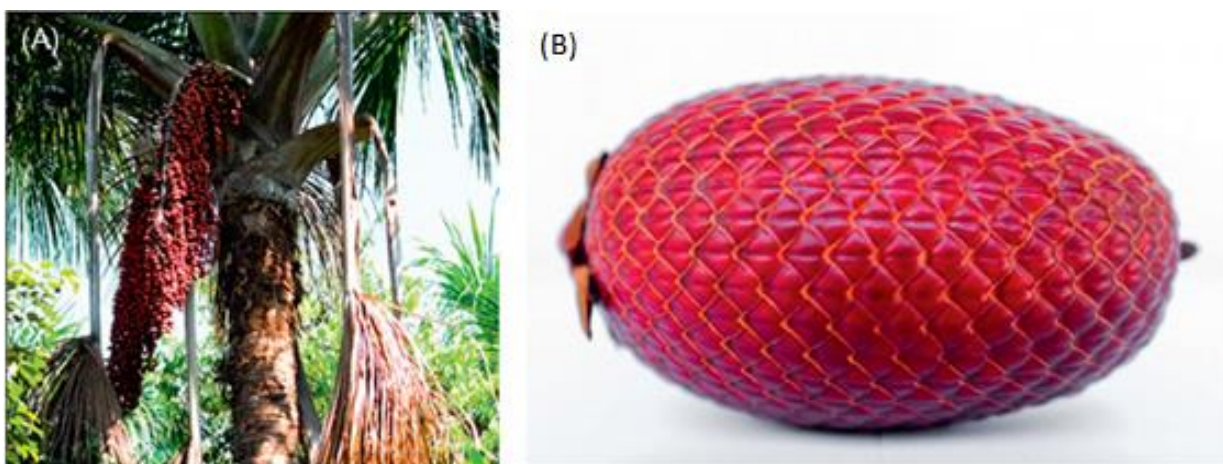
O buriti pode ser macho ou fêmea, sendo que as fêmeas que produzem os frutos. Em uma safra, cada buriti fêmea pode produzir entre 1 a 10 cachos com 450 a 2000 frutos maduros cada. O fruto possui forma oval, sendo sua casca composta por escamas castanho-avermelhadas (Figura 1). A polpa é carnosa e amarelada ou alaranjada, sendo 20 vezes mais concentrada em vitamina A do que a cenoura (SAMPAIO; CARRAZZA, 2012).

Do seu fruto, pode ser extraído o óleo fixo, que possui em sua composição diversos minerais, carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico, compostos fenólicos, ácidos graxos monoinsaturados e fitosteróis (PEREIRA FREIRE et al., 2016, DA

COSTA et al., 2010; DARNET et al., 2011). A alta concentração de substâncias bioativas em sua composição o torna um promissor objeto de estudo de suas propriedades farmacológicas.

Estudos recentes demonstraram que o óleo de buriti possui propriedades antioxidantes (CANUTO et al., 2010, CANDIDO et al., 2015), fotoprotetoras contra radiações UVA e UVB (ZANATTA et al., 2010), antitrombóticas e antiplaquetárias (FUENTES et al., 2013). Além disso, compostos fenólicos presentes no buriti, principalmente ácido clorogênico e ácido cafeico, como também de quercetina e triterpenos, apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* (KOOLEN et al., 2013; BATISTA et al., 2011; DE SIQUEIRA et al., 2014)

Figura 1: (A) Buriti. (B) Fruto do Buriti.



Fonte: KOOLEN et al., 2018.

2.2 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias que agem sobre os microrganismos, podendo ser de origem natural (substâncias que já estão presentes na natureza) ou de origem sintética (substâncias sintetizadas em laboratório). Essas substâncias podem agir de duas formas: podem inibir o crescimento do microrganismo, interferindo em seu metabolismo e impedindo a sua proliferação, ou causando a sua morte (MOTA et al., 2010; NICOLAOU; RIGOL, 2017).

A terapia antimicrobiana se tornou a principal defesa contra as doenças infecciosas, e o seu descobrimento, no século XX, representa um dos maiores marcos da medicina moderna. No século XIX, doenças infecciosas como pneumonia,

tuberculose e difteria eram consideradas as principais causas de morte (ZAFFIRI et al., 2012). No entanto, a introdução dos antimicrobianos no século seguinte provocaram uma drástica diminuição na taxa de mortalidade por doenças infectocontagiosas (TAVARES et al., 2011).

Apesar de todo o avanço ao longo das décadas, o tratamento de doenças infecciosas ainda é um desafio nos dias atuais. Isso ocorre porque cada vez mais surgem novos casos de bactérias resistentes aos antibacterianos disponíveis no mercado (FRIERI et al., 2017; FRIEDMAN et al., 2015). Dentre vários fatores que podem ser associados como causas desse problema, é possível destacar dois: primeiro, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos disponíveis na natureza como mecanismo de sobrevivência, e grande parte dos medicamentos são de origem natural ou semissintética (TAVARES et al., 2011).

Segundo, o uso irracional e indiscriminado dos antimicrobianos tem contribuído para as bactérias adquirirem mecanismos de resistência (MOTA et al., 2010). A resistência bacteriana vem se apresentando como uma grande ameaça à saúde da população, tornando assim urgente a necessidade da descoberta de novos antimicrobianos para combater as cepas resistentes e diminuir a taxa de mortalidade associada a esse fator (RATHER et al., 2017).

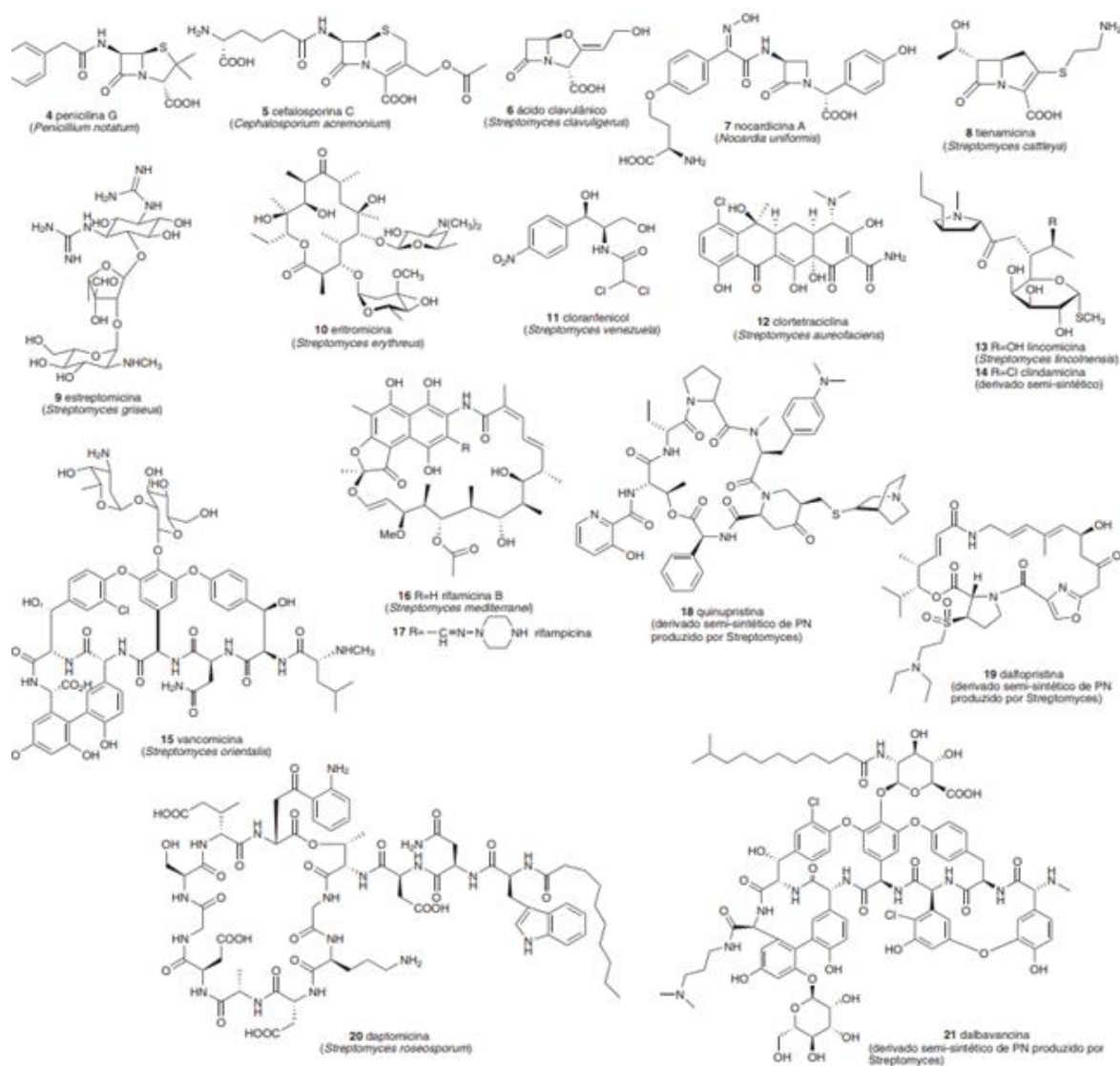
2.3 Antibióticos x antimicrobianos x antibacterianos

Os termos antibióticos, antimicrobianos e antibacterianos são amplamente utilizados na literatura. Muitos acreditam que possuem o mesmo significado e podem ser intercambiáveis, porém, possuem significados distintos, e é preciso conhecê-los para que não sejam utilizados erroneamente.

O termo antibiótico, sugerido inicialmente em 1942 por Waksman, se refere às substâncias produzidas por microrganismos que são capazes de inibir o crescimento ou destruir outros microrganismos (WAKSMAN, 1947). Portanto, são substâncias obtidas de origem natural. A maioria dos antibióticos utilizados na prática clínica hoje é obtida de fungos que fazem parte dos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Micromonospora*, e de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* (Figura 2) (TAVARES, 2014).

Por outro lado, os antimicrobianos são um grupo de substâncias que podem ser de origem natural (antibióticos), semissintéticas ou sintéticas (quimioterápicos), e que são utilizados para impedir o crescimento ou destruir os microrganismos, sendo eles bactérias, fungos, vírus ou protozoários (BRASIL, 2001). Entre os antibióticos, a penicilina é o principal representante, sendo que, a partir dela, foram sintetizados análogos que deram origem ao grupo de fármacos betalactâmicos, que compõem a maior parte dos fármacos semissintéticos (GUIMARÃES et al., 2010).

Figura 2: Principais classes de antibióticos.

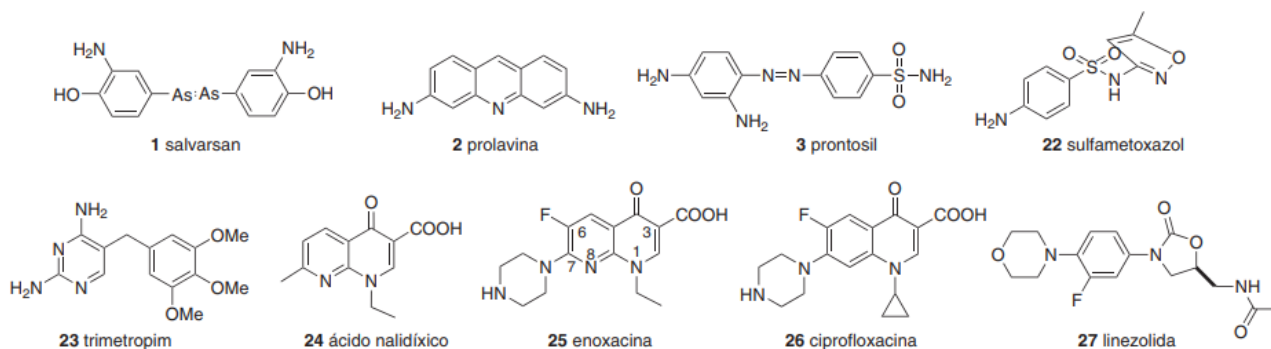


FONTE: GUIMARÃES et al., 2010

Dentro do grupo dos quimioterápicos (Figura 3), tem-se dois representantes: as sulfas e as quinolonas. As sulfas são análogas de fatores de crescimento e sua primeira representante, a arsfenamina, foi inicialmente inserida em 1910 por Paul Erlich e Sahachiro Sata, sendo considerada a “bala mágica” para o tratamento da sífilis no início do século XX (ZAFFIRI, 2012, MADIGAN, 2016). Décadas depois, em 1962, foi descoberto o primeiro fármaco do grupo das quinolonas, a cloroquina, e hoje as quinolonas são a única classe de fármacos que competem com os betalactâmicos no uso clínico (ZAFFARI, 2013; NOGUEIRA, 2012).

Por fim, os antibacterianos são substâncias que agem somente contra as bactérias. A maior parte do antimicrobianos são antibacterianos, e eles podem agir de duas formas: inibindo o crescimento e proliferação das células bacterianas, sendo assim denominados bacteriostáticos; ou então levando à morte e destruição das células, conhecidos como bactericidas (NEMETH et al., 2014; OCAMPO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2010).

Figura 3: Exemplos de quimioterápicos.



FONTE: GUIMARÃES et al., 2010.

2.4 Extratos de plantas que possuem atividade antimicrobiana

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças infecciosas estão entre as 10 principais causas de mortes no mundo. Infecções respiratórias baixas, doenças diarreicas e tuberculose foram responsáveis por 5,7

milhões de mortes em 2016 (OMS, 2018). O aumento da resistência bacteriana e a toxicidade de alguns fármacos aumentaram a necessidade da busca por novos agentes antimicrobianos (TINTINO et al., 2015). A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais tem sido alvo de pesquisas por possuírem em sua composição diversos compostos com atividades biológicas. (ELLER et al., 2015).

Para exemplificar, Costa et al. (2011) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum*), que demonstrou atividade contra as cepas *S. flexneri*, *S. choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. pneumomoniae*. Os autores realizaram também uma determinação de ácidos graxos na amostra, e relataram uma predominância de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido oleico.

Enquanto isso, Emeka et al. (2015) avaliaram o efeito do óleo extraído do cominho preto (*Nigella sativa*) contra cepas de *S. aureus* isoladas de feridas de pacientes diabéticos e resistentes a várias drogas. O estudo demonstrou que mais da metade dos isolados apresentaram sensibilidade às mais variadas concentrações do óleo.

O potencial antimicrobiano e citotóxico de quatro frações e um extrato etanólico da espécie *Pouteria venosa* também foram investigados por Santos et al. (2015). As frações e o extrato etanólico demonstraram atividade antibacteriana em três bactérias Gram-positivas, sendo elas: *S. aureus*, *S. epidermides* e *S. pneumoniae*, e cinco bactérias Gram-negativas: *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *P. mirabilis*, *A. calcoaceticus* e *E. aerogenes*.

Por outro lado, o efeito da associação do extrato etanólico do fruto de *Morinda citrifolia* L. com antimicrobianos já utilizados na clínica foi analisado por Tintino et al. (2015). Foi observado nesse estudo um efeito sinérgico da associação do extrato com três das drogas testadas: amicacina, gentamicina e imipenem, com redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos perante as cepas das bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Por fim, Eller et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana em seis extratos vegetais, sendo que três deles mostraram-se ativos contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Os extratos que apresentaram atividade foram: cajueiro (*Anacardium occidentale* L), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e barbatimão (*Stryphnodendron*

adstringens) apresentando halos de inibição de 11, 13 e 17 mm de diâmetro, respectivamente.

Portanto, é possível observar na literatura que os extratos vegetais tem despertado o interesse tanto por apresentarem atividade antimicrobiana, quanto por terem a capacidade de potencializar o efeito de fármacos (TINTINO et al., 2015). Dada a vasta variedade de plantas com propriedades biológicas presentes nos biomas brasileiros, e a crescente preocupação perante os microrganismos resistentes, faz-se necessária a investigação por novos agentes para o tratamento de infecções em plantas e extratos vegetais.

2.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos – Microdiluição em caldo

Existem diversos testes laboratoriais utilizados para avaliar a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. O método a ser realizado neste estudo é a técnica padrão de microdiluição em caldo, que será realizada seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Com esse teste, é possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da substância testada (SANTOS et al., 2012; PRIDMORE et al., 2011; SOUZA et al., 2016; PEIXOTO et al., 2016).

O método consiste em adicionar a substância a ser testada em microplacas de 96 poços, com uma concentração definida. Deve-se então realizar diluição seriada da substância teste, completar o volume com caldo e adicionar o inóculo nos poços. Assim, é possível analisar o crescimento bacteriano em diferentes concentrações da substância. Após incubar as placas em estufa, realiza-se a leitura das mesmas em leitora de microplacas. A partir disso, é possível calcular a CIM, ou seja, a menor concentração da substância em que houve inibição do crescimento microbiano (CLSI, 2018; SANTOS et al. 2012).

A CBM é definida como a menor concentração da substância teste capaz de matar a bactéria testada (PEIXOTO et al., 2016). Para determiná-la, deve-se retirar uma alíquota de cada poço cuja concentração da substância-teste inibiu o crescimento bacteriano e semear em ágar. Após incubação em estufa, deve-se observar qual a

menor concentração que foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado (SANTOS et al., 2012; PRIDMORE et al., 2012; SOUZA et al., 2016).

O meio de cultura utilizado para realizar os Testes de Sensibilidade aos antimicrobianos é o Mueller-Hinton (MH). O caldo é utilizado para a determinação da CIM, e o ágar para a determinação da CBM. Esse meio apresenta inúmeras vantagens para a realização deste teste, dentre elas: apresenta alta reprodutibilidade entre os lotes, contém baixos teores de inibidores de antimicrobianos, produz crescimento satisfatório da maior parte dos patógenos e há uma grande variedade de dados e resultados de testes de sensibilidade realizados com esse meio (CLSI, 2018)

2.6 Ensaio de viabilidade celular

Produtos cosméticos podem, ocasionalmente, desencadear reações adversas aos seus usuários. Por isso, antes de disponibilizar um produto para uso humano, é preciso analisar o seu potencial tóxico (CHORILLI et al., 2009). Além disso, o uso de plantas e extratos vegetais em formulações cosméticas é outro fator importante a ser considerado, pois a sua utilização tem crescido substancialmente durante os anos. No entanto, há poucos relatos na literatura em relação ao potencial citotóxico desses extratos (CHIARI et al., 2012).

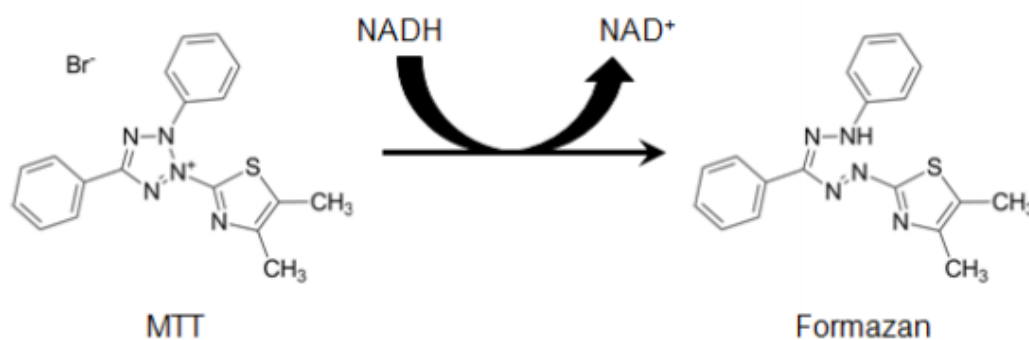
Os ensaios de toxicidade sempre foram realizados utilizando animais, sendo o melhor modelo experimental para avaliação dos riscos da utilização de determinado produto (CHIARI et al., 2012). No entanto, a utilização de animais para se determinar o perfil toxicológico de cosméticos tem sido bastante questionado em relação às questões éticas que envolvem estes experimentos (DA CRUZ et al., 2012). Portanto, métodos *in vitro* tem sido utilizado como uma alternativa à utilização de animais em experimentos (SEHNEM et al., 2012).

Um dos ensaios que pode ser realizado é o de citotoxicidade, o qual define o potencial de degeneração ou morte celular que é provocado pelos constituintes das formulações cosméticas. Alguns métodos que podem determinar a citotoxicidade de produtos cosméticos são: citotoxicidade pelo método MTT, citotoxicidade pelo método

vermelho neutro (NRU) e citotoxicidade pela difusão em gel agarose, no qual se utiliza o MTT ou o NRU como corante vital (DA CRUZ et al., 2012).

O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um sal de tetrazólio que foi introduzido por Mosmann para avaliar a proliferação e viabilidade celular. Esse composto mede a função mitocondrial da célula, ou seja, avalia o nível de sua funcionalidade e viabilidade (PRÄBST et al., 2017). Esse ensaio baseia-se na comprovação da citotoxicidade através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (enzima mitocondrial redutase) e do seu respectivo potencial redox. A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (coloração amarela e solúvel em água) a formazan (coloração roxa e insolúvel em água) pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP (BOCHNIE et al., 2017)

Figura 4: Redução do MTT a formazan.



Fonte: RISS et al., 2016

Por outro lado, citotoxicidade pelo método Vermelho Neutro consiste na utilização de culturas de células SIRC CCL 60 (derivadas da córnea de coelhos), dentre outras. A captação do corante pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria. Enquanto isso, o teste de citotoxicidade pela difusão em gel de agarose consiste na aplicação do produto testado na superfície de um gel agarose em contato com células de tecido conjuntivo de camundongo, gerando um halo que é revelado utilizando os corantes MTT ou NRU. O diâmetro do halo corresponde a citotoxicidade do produto testado (DA CRUZ et al., 2012).

Além dos testes de citotoxicidade, outras análises podem ser realizadas para analisar se a formulação cosmética é apropriada para utilização, como: avaliação do

potencial de irritação ocular, da atividade fototóxica, da absorção cutânea, da atividade mutagênica, dentre outros (CHIARI et al., 2012). Todos esses testes, incluindo o teste de citotoxicidade, são medidas importantes e necessárias para se disponibilizar um novo produto cosmético para uso humano, e excelentes alternativas à experimentação em animais.

3. JUSTIFICATIVA

Segundo lista divulgada pela OMS, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) está entre os 12 patógenos em que a necessidade pela descoberta de novos antimicrobianos é urgente, se enquadrando na prioridade 2 (alta). Os frutos do buriti são ricos em vitaminas (A, B, C, E) e ferro, além de ácidos graxos insaturados, carotenóides e tocoferóis, conforme encontrado na literatura. Devido a sua rica composição em substâncias com atividades biológicas, o óleo de buriti é considerado matéria prima em potencial para avaliar suas propriedades antimicrobianas e ser incorporado em formulações cosméticas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano e citotoxicidade de formulação cosmética contendo óleo de buriti.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de formulação cosmética contendo óleo de buriti por meio de teste de microdiluição em caldo frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, e

- Determinar a sua citotoxicidade por meio de ensaio da viabilidade celular da linhagem de queratinócitos (HaCat), pela redução do MTT.

5. METODOLOGIA

5.1 Elaboração da emulsão contendo óleo de buriti

A formulação utilizada no presente estudo foi elaborada no Laboratório de Tecnologias da Universidade de Brasília – FCE, como parte do trabalho de conclusão de curso da aluna Clarissa Machado e Dias Borges (BORGES, 2019). Em seu trabalho, a autora elaborou 8 diferentes formulações do creme contendo óleo de Buriti, variando entre diferentes espessantes e concentrações, conforme tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1: Desenho do desenvolvimento de emulsão contendo óleo de Buriti (*Mauritia flexuosa* L.).

| ATIVO | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Digluconato de clorexidina sol. aq. 2% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% |
| Propilenoglicol | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% |
| CMC | X | X | X | 3% | 1% | 0,50% | X | X |
| Amido de tapioca | X | X | X | X | X | X | 3% | 2% |
| EDTA (Edetato dissódico) | 0,10% | 0,10% | 0,10% | 0,10% | 0,10% | 0,10% | 0,10% | 0,10% |
| Água destilada | q.s.p. | q.s.p. | q.s.p. | q.s.p. | q.s.p. | q.s.p. | q.s.p. | q.s.p. |
| Cera Polawax | 15% | 20% | 20% | 15% | 15% | 15% | 15% | 15% |
| Óleo de Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>) | 5% | 5% | 2,5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% |
| BHT | 0,05% | 0,05% | 0,05% | 0,05% | 0,05% | 0,05% | 0,05% | 0,05% |

FONTE: BORGES, 2019 (adaptado)

Para a preparação de cada emulsão, as matérias primas foram pesadas separadamente em balança. Para completa dissolução do EDTA, o mesmo foi

colocado junto com a solução aquosa de digluconato de clorexidina, o propilenoglicol e cerca de 5mL de água destilada em ultrassom durante 15 minutos. As fases aquosa e oleosa foram aquecidas em chapa aquecedora até atingirem 75°C para o preparo. Com o auxílio do agitador mecânico, verteu-se lentamente a fase oleosa sobre a fase aquosa, mantendo sobre agitação constante, até arrefecimento. Após arrefecimento, o pH foi ajustado a 5.

Das 8 formulações elaboradas, a F3 foi a selecionada para realizar os testes deste estudo, contendo 2,5% de óleo de buriti e 5% de clorexidina. No entanto, com o intuito de esclarecer melhor a ação do creme e o potencial antimicrobiano do óleo de buriti no mesmo, foi produzida uma nova formulação (Figura 5), realizando adaptações a partir da formulação já elaborada. Nesta nova formulação (F9), foi retirado o agente conservante clorexidina, e utilizou-se 5% de óleo de buriti, o dobro da concentração anterior. Os componentes das formulações estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Comparação dos componentes das duas formulações testadas.

| Ativo | Função farmacotécnica | Fase | %p/p | |
|---|----------------------------------|------------------------|--------|--------|
| | | | F3 | F9 |
| Digluconato de clorhexidina sol. aq. 2% | Conservante microbiológico | Aquosa | 5% | X |
| Propilenoglicol | Agente quelante | Aquosa | 5% | 5% |
| EDTA (Edetato dissódico) | Conservante, umectante | Aquosa | 0,10% | 0,10% |
| Amido de tapioca | Agente de viscosidade | Aquosa | X | 2% |
| Água destilada | Veículo da fase aquosa | Aquosa | q.s.p. | q.s.p. |
| Cera polawax | Emulgente, agente de viscosidade | Oleosa | 20% | 15% |
| Óleo de buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> L.) | Princípio ativo, emoliente | Oleosa | 2,5% | 5% |
| ButilHidroxiTolueno | Antioxidante | Oleosa | 0,05% | 0,05% |
| Solução de ácido cítrico 5% | Corretivo de pH | Aditivo pós elaboração | q.s.p. | X |

FONTE: Autoria própria.

Figura 5: Amostra da formulação produzida contendo 5% de óleo de buriti e sem a adição de clorexidina.



Fonte: Autoria própria.

5.2 Ensaio de viabilidade celular

5.2.1 Material biológico

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, foi utilizada a linhagem celular de queratinócitos (linhagem HaCat) de origem humana. As células foram estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Brasília e, conforme necessário, descongeladas uma semana antes do ensaio, e aclimadas em um frasco para cultivo (25 cm², TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium*) suplementado com 1%

de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantido em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

Após as células atingirem confluência ideal para os experimentos (cerca de 10³), elas eram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Inicialmente, o meio de cultura DMEM era descartado e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato-salina (PBS). Logo após, as células eram incubadas com solução de tripsina EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37 °C. Adicionalmente, colocava-se meio DMEM às células para neutralizar a ação da tripsina e esta suspensão era centrifugada por 3 minutos a 300 *g*. Após a centrifugação, o sobrenadante era removido e o *pellet* de células era ressuspendido em meio DMEM (1 a 3 mL). Em seguida, uma alíquota da suspensão de células era usada para contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

5.2.2 Tratamento e Ensaio de Viabilidade Celular

Os grupos experimentais foram divididos em: formulação do óleo de buriti presente e o controle negativo (sem a formulação). Os tratamentos foram realizados em triplicata. As células foram transferidas para uma placa de cultura de 96 poços (3000 células/poço) e tratadas com variadas concentrações dos produtos, partindo-se de uma concentração de 1 mg/mL e, foram incubadas com os tratamentos por 24 horas.

Em seguida, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados. Após 3 horas de incubação em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o produto formado. A quantificação da viabilidade celular foi determinada após a leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm.

5.2.3 Análise estatística

Foram executadas análises da repetibilidade dos dados pelo cálculo do Intervalo de Correlação Intraclassa a 95% e cálculos de IC 50 foram executados pela

metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPadprism versão 7.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

5.3 Teste de microdiluição em caldo

Para a realização do teste de microdiluição em caldo, os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, que foram inoculados em Mueller-Hinton (caldo MH). A concentração foi ajustada pela turbidez de 0,5 na escala de McFarland, com 1×10^8 UFC/mL (abs). Foram realizadas diluições das culturas em soro, com auxílio espectrofotômetro de densidade óptica (D.O.) a 625 nm resultando em uma concentração final de 1×10^6 UFC/mL (abs).

A concentração inicial das formulações cosméticas foi de 2,5 mg/mL, para a formulação contendo clorexidina, e de 5 mg/mL para a formulação produzida sem clorexidina. A partir dessas concentrações foram realizadas diluições sucessivas, sendo que as concentrações finais utilizadas nos testes foram de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; 0,010; 0,005; 0,0025 e 0,0012 mg/mL para a primeira, e de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; 0,010; 0,005; 0,0025 mg/mL para a segunda.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, de fundo chato, em triplicata. Cada poço recebeu 80 µL de caldo MH, 100 µL de formulação cosmética e 20 µL do inóculo ajustado para a concentração de 1×10^6 UFC/mL, resultando em uma concentração final de 1×10^5 UFC/mL por poço. Cada poço apresentou, portanto, um volume final de 200 µL.

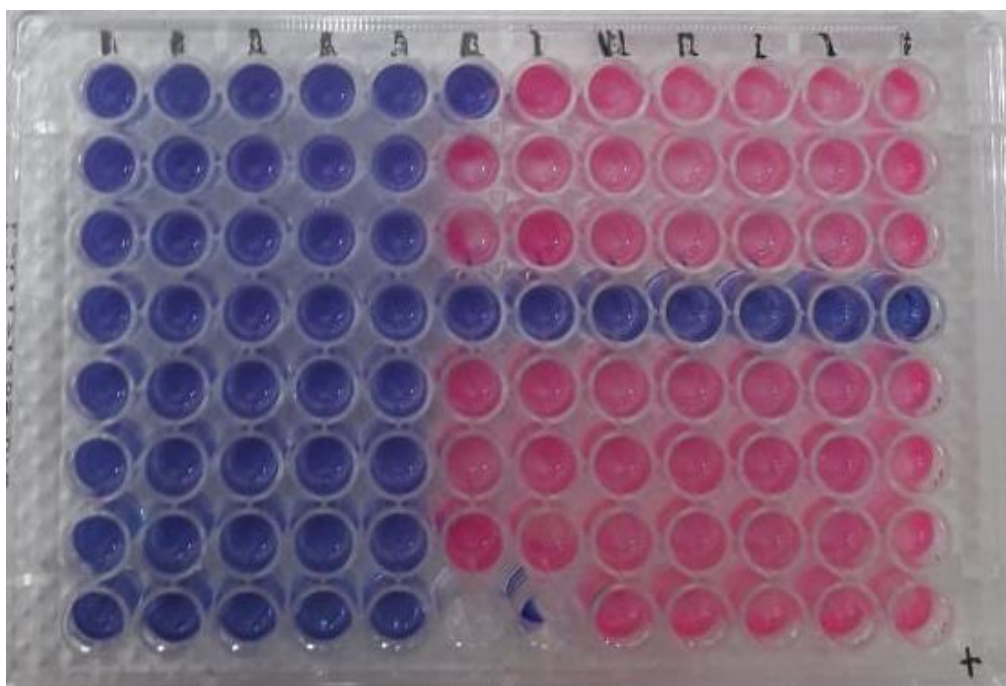
No controle positivo, cada poço recebeu 180 µL de caldo MH e 20 µL do inóculo na concentração de 1×10^6 UFC/mL. Para evitar interferência de coloração das formulações e do caldo MH, foi utilizado como branco 100 µL de caldo MH e 100 µL da formulação.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas e o procedimento foi realizado em triplicata. A leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca Multiskan, com comprimento de onda de 630 nm. Após a leitura das placas, foi adicionado 30 µL do corante resazurina em cada poço (Figura 6), para evidenciar o crescimento (coloração rosa) ou inibição (coloração azul) da bactéria.

5.3.1 Análise estatística

Os resultados foram descritos em termos de porcentagem de inibição, considerando-se a fração da leitura do poço testado e o controle de crescimento. Para o cálculo do CIM, a metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal foi executada sobre a porcentagem de inibição nas diferentes concentrações, via programa GraphPrism versão 7.0. A CBM foi determinada por estimativa do cálculo sob o valor do CIM, com uso do software GraphPrism versão 7.0.

Figura 6: Método de microdiluição em caldo utilizando creme com óleo de buriti e clorexidina frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Autoria própria.

6. RESULTADOS

6.1 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular, realizado partir da técnica de redução do MTT, foi realizado com as duas formulações do creme, com e sem a clorexidina. Verificou-

se, então, que um IC 50 de 5232 µg/mL para a formulação contendo clorexidina, e de 6280 µg/mL para a formulação sem clorexidina, resultados que não diferem estatisticamente do controle negativo. Os dados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat.

| Linhagem de queratinócitos HaCat | | | |
|---|--------------------|------------------------------|--------------------------|
| | <i>Creme total</i> | <i>Creme sem clorexidina</i> | <i>Controle negativo</i> |
| IC 50 (µg/ml) | 5232 | 6280 | 6230 |
| Intervalo de confiança | 3250-7235 | 4762-8253 | 4385-8323 |

IC50 = concentração do composto necessária para 50% de viabilidade.

FONTE: Autoria própria.

Portanto, observando-se os resultados, foi verificado que as formulações obtidas não apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem de células queratinócitos humanas (HaCat).

6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo, para avaliar a atividade antimicrobiana, foi realizado com o creme com clorexidina (concentração inicial de 0,25%) e com o creme sem clorexidina (concentração inicial de 0,5%). Para realizar uma melhor análise do potencial antimicrobiano de cada componente separadamente, o teste também foi realizado com o óleo de buriti puro (concentração inicial de 0,025%) e com uma solução de clorexidina (concentração inicial de 0,00025%), em diferentes dias, utilizando o mesmo método e os mesmos equipamentos.

Os valores de inibição do crescimento microbiano foram obtidos por meio de leitura em leitora de microplaca Multiskan, com comprimento de onda de 630 nm. Após a leitura, foi adicionado o corante Resazurina 0,01% às placas, para uma melhor

visualização da inibição gerada pelos materiais testados. Este corante é um indicativo do metabolismo celular das bactérias, tornando-se rosa onde há células viáveis, e roxo onde houve inibição do crescimento das cepas.

Após a leitura, os resultados obtidos foram avaliados e foi calculada a CIM, em porcentagem, de cada composto, conforme mostra a Tabela 4. Nesta tabela, são apresentados três parâmetros importantes para a determinação da atividade antimicrobiana dos materiais testados, sendo eles: concentração inibitória mínima (CIM), intervalo de confiança (IC 95) e concentração bactericida mínima (CBM).

Tabela 4: Concentração inibitória mínima, intervalo de confiança e concentração bactericida mínima dos materiais testados.

| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | |
|----------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|---|
| | <i>Creme total</i> | <i>Creme sem clorexidina</i> | <i>Óleo</i> | <i>Clorexidina</i> |
| IC50 (CIM) (%) | 0,0071 | 0,03130 | 0,0763 | $2,17 \times 10^{-6}$ |
| IC95(IC₅₀) (%) | 0,0049 a 0,010 | 0,0110 a 0,0880 | 0,0432 a 0,1348 | $2,82 \times 10^{-7}$ a $1,67 \times 10^{-5}$ |
| IC99,9 (CBM) (%) | 7,0929 | 31,2687 | 76,2237 | 0,0022 |

IC50: concentração necessária para inibir 50% do crescimento microbiano

IC95%: Intervalo de confiança a 95%

CBM: Concentração que resulta na morte bacteriana

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração do composto capaz de causar uma inibição do crescimento bacteriano. Neste trabalho, esse parâmetro é expresso pelo IC50, que se refere à menor concentração necessária para inibir o crescimento de 50% das células bacterianas. O IC 95 é o intervalo de confiança referente ao IC50. Enquanto a CBM é a menor concentração necessária para causar a morte da bactéria, sendo expressa pelo IC 99,9.

Como é possível observar na tabela, o creme total, com a adição de clorexidina, apresentou um valor de IC50 referente a 0,0071%, com um intervalo de confiança entre 0,0049 a 0,010% e um valor de CBM equivalente a 7,0929%. A formulação sem clorexidina apresentou um valor de IC50 equivalente a 0,0313%, sendo que seu intervalo de confiança foi de 0,0110 a 0,0880%, e um valor de CBM de 31,2687%.

Enquanto isso, o óleo puro apresentou um IC50 de 0,0763%, com um intervalo de confiança entre 0,0432 a 0,1348%, e um valor de CBM equivalente a 76,2237%. Por fim, a solução de clorexidina testada isoladamente apresentou um IC50 extremamente baixo, conforme esperado, de 0,00000217%, com um intervalo de confiança entre 0,000000282% a 0,0000167% e um valor de CBM de 0,0022%.

Analisando os resultados obtidos, é possível observar que as formulações produzidas apresentam atividade contra a cepa testada. A formulação com clorexidina apresentou uma potência maior em relação ao creme sem clorexidina, porém, isso se deve ao fato da clorexidina ser um agente conservante e possuir propriedades antimicrobianas, como é muito bem expressado em seu valor de CIM.

No entanto, o creme sem a adição de clorexidina também apresentou um valor de CIM satisfatório, visto que uma pequena concentração da formulação foi capaz de causar inibição do crescimento bacteriano. O óleo de buriti testado também apresentou um potencial de inibição promissor, pouco diferenciando-se da concentração de inibição do creme sem a clorexidina.

7. DISCUSSÃO

7.1 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular, pelo método de redução do MTT, é um dos ensaios *in vitro* descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a avaliação da segurança em produtos cosméticos (ANVISA, 2012). A determinação da citotoxicidade em produtos cosméticos é um passo importante, pois, se um material é capaz de induzir citotoxicidade em culturas de células, é muito provável que ele também apresente toxicidade em testes com seres humanos (SANTOS, 2015).

Além disso, o uso da linhagem celular de queratinócitos (linhagem HaCat) para a determinação da citotoxicidade da emulsão é um fator importante. Apesar de alguns autores as considerarem menos sensíveis a irritação em comparação a outras linhagens celulares, as células queratinócitas são preferíveis em estudos como este, pois, em uso clínico, elas são as primeiras células a serem expostas ao uso dos cosméticos (ZANATTA, 2008).

Sendo assim, conforme exposto na Tabela 3, a formulação contendo óleo de buriti e clorexidina apresentou um valor de IC₅₀ de 5232 µg/mL, e a formulação sem a adição de clorexidina apresentou valor de IC₅₀ de 6280 µg/mL, valores que não diferem estatisticamente do controle negativo. Além disso, os critérios de citotoxicidade para novos compostos, conforme estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), são de IC₅₀ < 20 µg/mL no ensaio preliminar para serem considerados com atividade citotóxica (Abdel-Hameed et al., 2012).

Portanto, as formulações produzidas não têm efeito citotóxico em células HaCat, e por critérios estabelecidos pelo NCI, podem ser consideradas como inócuas e seguras para uso clínico. No entanto, novos testes devem ser executados para compreender o comportamento das células da linhagem de queratinócitos frente aos tempos experimentais mais prolongados de 48h e 72 h.

7. 2 Teste de microdiluição em caldo

A busca pela descoberta de novos antimicrobianos vem se tornando algo cada vez mais desafiador. Grande parte das drogas introduzidas na clínica para o tratamento de infecções se mostraram ter eficácia limitada, visto o rápido desenvolvimento e surgimento de cepas resistentes (WRIGHT, 2012).

Dentre estas cepas, a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* é capaz de causar uma enorme variedade de doenças, desde infecções de pele a condições mais graves, como pneumonia (SASS, 2012). Este patógeno representa o maior constituinte da microbiota da pele e é responsável por diversas infecções cutâneas, variando de infecções superficiais até problemas infecções profundas em feridas, muitas vezes levando a septicemia (EMEKA, 2015).

Levando em consideração a crescente resistência aos antimicrobianos e a dificuldade no tratamento de infecções, houve aumento na busca de plantas medicinais e extratos vegetais com potencial de combater às doenças infecciosas. Drogas vegetais possuem várias vantagens em comparação às drogas sintéticas, como por exemplo: menor toxicidade e a combinação de várias substâncias benéficas à saúde humana (EMEKA, 2015)

Avaliando todos estes parâmetros e pensando na crescente necessidade da

busca de novos agentes antimicrobianos, foi desenvolvida uma emulsão contendo como princípio ativo o óleo de buriti. A formulação desenvolvida, por ser de uso tópico, foi produzida buscando o tratamento de infecções cutâneas leves a moderadas, visando, inicialmente, o tratamento de infecções contra patógenos gram-positivos.

Porém, um dos excipientes adicionados à formulação do creme foi a bisbiguanida clorexidina, com o objetivo de obter-se uma ação conservante. No processo de fabricação de formulações, deve-se seguir procedimentos que devem minimizar o risco de contaminações. No entanto, conservantes devem ser utilizados para preservar a formulação, impedindo o crescimento microrganismos que podem causar doenças, ou até mesmo produzir substâncias capazes de alterar as propriedades químicas, físicas e farmacológicas do produto. Dessa forma, aumenta-se a vida útil do produto (SCHMITT, 2015).

A clorexidina possui propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, pode-se apresentar na forma de diversos sais, sendo o digluconato o mais utilizado por ter maior solubilidade em água. Em concentração elevada, a clorexidina causa coagulação e precipitação das proteínas citoplasmáticas, levando à morte bacteriana. Em concentrações mais baixas, altera-se a integridade da membrana celular, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos (HIGIOKA, 2013)

Porém, com o objetivo de elucidar melhor o potencial antimicrobiano do óleo de buriti, foi produzida uma formulação contendo os mesmos componentes e proporções, porém, retirando-se a clorexidina. Foram realizados testes com ambas as formulações e determinado a sua CIM. Além disso, também foram realizados testes com o óleo de buriti puro e a clorexidina pura, para uma melhor visualização do componente que está realizando a inibição.

Com os resultados obtidos, pode-se observar que as formulações produzidas apresentaram atividade antimicrobiana contra a cepa testada. A formulação com clorexidina apresentou um CIM de 0,0071%, o que equivale a 0,071 mg/mL, enquanto o creme produzido sem a adição de clorexidina apresentou um CIM de 0,03130, equivalente a 0,313 mg/mL. Devido à ação da clorexidina, a formulação com a adição deste conservante apresentou um maior potencial de inibição. Porém, a formulação sem clorexidina também apresentou valores de inibição satisfatórios.

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis et al. (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5 mg/mL são

inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos. Enquanto Webster et al. (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000 µg/mL (1mg/mL) ou menos.

Além disso, em seu trabalho, Holetz et al. (2002) determinaram alguns parâmetros referência para a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Foi considerado que, se o extrato apresentar um CIM menor do que 100 µg/ml, apresenta boa atividade antimicrobiana; de 100 a 500 µg/ml a atividade antimicrobiana é considerada moderada; de 500 a 1000 µg/ml a atividade antimicrobiana é considerada fraca; e acima de 1000 µg/ml é considerado que não há atividade.

Sendo assim, ambas as formulações produzidas são consideradas inibidores potentes do crescimento bacteriano de acordo com Aligiannis et al. (2001), e inibidores satisfatórios de acordo com Webster et al. (2008). Em relação ao óleo de buriti puro, o valor de CIM determinado foi de 0,0763%, equivalente à 0,763 mg/mL. Sendo assim, de acordo com Holetz et al. (2002), o óleo de buriti possui um potencial de inibição considerado fraco. Em relação aos outros autores, para Aligiannis et al. (2001) o potencial de inibição é considerado moderado, e para Webster et al. (2008) é considerado satisfatório.

É possível observar que os resultados encontrados estão de acordo com o que é descrito na literatura. Foram encontrados alguns relatos a respeito das propriedades antimicrobianas dos extratos do buriti. Batista et al. (2011) analisou a atividade antimicrobiana do óleo de buriti em 5 bactérias diferentes, sendo o *S. aureus* uma delas. Foi evidenciado que os patógenos apresentaram sensibilidade ao óleo de buriti, sendo apresentado maior inibição nas bactérias gram-positivas.

Adicionalmente, Soares (2014) avaliou o potencial antimicrobiano de três óleos, sendo um deles o de buriti, contra diferentes cepas, incluindo o *S. aureus*. Dentre os óleos testados, o óleo de buriti foi o que apresentou melhor atividade antimicrobiana contra os microrganismos e, principalmente, contra os gram-positivos. O CIM encontrado para o *S. aureus* foi o menor dentre todos os patógenos avaliados, sendo assim o microrganismo que apresentou maior sensibilidade à ação do óleo de buriti.

Além disso, não somente o óleo de buriti possui propriedades antimicrobianas, como também outros extratos dessa palmeira também foram avaliados em trabalhos científicos e apresentaram atividade contra diversas cepas, inclusive contra patógenos que apresentam algum mecanismo de resistência, como o *Staphylococcus aureus*

resistente à metilicina (MRSA) (DE SIQUEIRA et al., 2014; KOOLEN et al., 2013).

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que as formulações produzidas não possuem efeito citotóxico frente às células queratinócitas humanas testadas (HaCat), portanto, podem ser consideradas candidatas para testes clínicos. Além disso, as formulações testadas, contendo ou não clorexidina, apresentaram resultados satisfatórios em relação aos testes de microdiluição para determinar o potencial antimicrobiano, sendo consideradas inibidores do crescimento da cepa *S. aureus*, um patógeno fortemente presente na microbiota da pele humana.

Portanto, as formulações elaboradas são promissoras objetos de estudo para o tratamento de infecções cutâneas. Assim, novos testes em seres humanos deverão ser executados para verificar se há efeitos adversos, se a formulação creme hidratante apresenta características desejadas para o seu uso, tais como a hidratação da pele e preferência do consumidor pelo uso.

9. REFERÊNCIAS

- AQUINO, Jailane de Souza et al. Refining of buriti oil (*Mauritia flexuosa*) originated from the Brazilian Cerrado: physicochemical, thermal-oxidative and nutritional implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 212-219, 2012.
- BATISTA, Soares; OLINDA, Roberio Gomes; MEDEIROS, Vitor Brasil; *et al.* Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciencia Rural**, v. 42, n. 1, p. 136–141, 2012.
- BOCHNIE, Kariman Assis; GREGÓRIO, Paulo Cézar; MACIEL, Rayana Ariane Pereira. Análise da viabilidade celular por MTT em células tratadas com toxinas urêmicas. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, p. 42–51, 2016.
- BRASIL. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. **Anvisa**, v. 2, p. 1–74, 2012.
- CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* Lf) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313-319, 2015.

CANUTO, Gisele André Baptista; XAVIER, Ana Augusta Odorissi; LEANDRO, Camargo Neves; *et al.* Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196–1205, 2010.

CHIARI, Bruna Galdorfini et al. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323-330, 2012.

COSTA, José GM et al. Antibacterial properties of pequi pulp oil (*Caryocar coriaceum*–Wittm.). **International journal of food properties**, v. 14, n. 2, p. 411-416, 2011.

DA COSTA, Paulo Afonso et al. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1603-1606, 2010.

DA CRUZ, Sm; ANGELIS, Lh. Alternativas aos testes de segurança de cosméticos em animais. **Pós em revista do centro universitário Newton Paiva**, p. 195–202, 2012.

DARNET, Sylvain Henri et al. Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the Amazon region. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 488-491, 2011.

DE SIQUEIRA, Ezequias Pessoa et al. In vitro antibacterial action on methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus* and antitumor potential of *Mauritia flexuosa* L. f. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 48, p. 1408-1417, 2014.

DE SOUZA ELLER, Sarah Carobini Werner et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.

EMEKA, Lorina Badger; EMEKA, Promise Madu; KHAN, Tahir Mehmood. Antimicrobial activity of *Nigella sativa* L. seed oil against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic wounds. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 1985–1990, 2015

FRIEDMAN, N. Deborah; TEMKIN, Elizabeth; CARMELI, Yehuda. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416-422, 2016.

FRIERI, Marianne; KUMAR, Krishan; BOUTIN, Anthony. Antibiotic resistance. **Journal of infection and public health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.

FUENTES, Eduardo et al. *Mauritia flexuosa* presents in vitro and in vivo antiplatelet and antithrombotic activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

GELATTI, Luciane Cristina; BONAMIGO, Renan Rangel; BECKER, Ana Paula; *et al.* [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination]. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501–6, 2009.

GUIMARÃES, Denise Oliveira et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HIGIOKA, Angela Somavilla; BARZOTTO, Ionete Lúcia Milani. Desenvolvimento e controle físico-químico de sabonete líquido com digluconato de clorexidina. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 537–543, 2013.

HORN, Nathan; BHUNIA, Arun K. Food-associated stress primes foodborne pathogens for the gastrointestinal phase of infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–16, 2018.

KOOLEN, Hector HF et al. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 467-473, 2013.

KOOLEN, Hector HF et al. Buriti fruit—*Mauritia flexuosa*. In: **Exotic Fruits**. Academic Press, 2018. p. 61-67.

LIPINSKA, U. et al. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: A rabbit model. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 4–11, 2011.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32–37, 2014.

MADIGAN, Michael T. et al. *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

Miklasinska-Majdanik M, Kepa M, Wojtyczka R.D, et al. Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Aureus* Clinical Strains. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 2018, 15, 2321.

MOTA, Letícia M. et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

MOULTON-BROWN, Claire E.; FRIMAN, Ville Petri. Rapid evolution of generalized resistance mechanisms can constrain the efficacy of phage–antibiotic treatments. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 9, p. 1630–1641, 2018

NEMETH, Johannes; OESCH, Gabriela; KUSTER, Stefan P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 382-395, 2015.

NICOLAOU, Kyriacos C.; RIGOL, Stephan. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 2, p. 153, 2018.

NOGUEIRA, Antônio Francisco et al. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 1, p. 3-9, 2012.

OCAMPO, Paolo S. et al. Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4573-4582, 2014.

OTTO, Michael. Staphylococcus aureus toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32–37, 2014.

PEIXOTO, Rodolfo De Moraes et al. Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against Staphylococcus spp. Isolates from small ruminants with mastitis. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 3, p. 758-763, 2016.

PEREIRA FREIRE, Joilane Alves et al. Phytochemistry profile, nutritional properties and pharmacological activities of Mauritia flexuosa. **Journal of food science**, v. 81, n. 11, p. R2611-R2622, 2016.

PRÄBST, Konstantin et al. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: **Cell Viability Assays**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 1-17.

PRIDMORE, Andrew; BURCH, David; LEES, Peter. Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of tiamulin against field isolates of Actinobacillus pleuropneumoniae. **Veterinary microbiology**, v. 151, n. 3-4, p. 409-412, 2011.

RATHER, Irfan A. et al. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 4, p. 808-812, 2017.

SAMPAIO, M. B.; CARAZZA, L. R. **Aproveitamento Integral do Fruto e da Folha do Buriti (Mauritia flexuosa)**. [s.l.: s.n.], 2012

SANTOS, R. F. E. P. et al. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie Pouteria venosa (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 367-373, 2015.

SANTOS, Thalita Gilda et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de Piper malacophyllum (C. Presl.) C. DC. **Quim. Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SASS, Peter; BERSCHIED, Anne; JANSEN, Andrea; *et al.* Genome sequence of Staphylococcus aureus VC40, a vancomycin- and daptomycin-resistant strain, to study the genetics of development of resistance to currently applied last-resort antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2107–2108, 2012.

SEHNEM, Dayany Pereira et al. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 6, n. 2, 2012.

SOUZA, A. A. et al. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre Escherichia coli enterotoxigênica. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 18, n. 1, p. 105-112, 2016.

TAVARES, Tatiane Teixeira et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011

TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2014

TINTINO, Saulo Relison et al. Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia* L. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 3, p. 193-200, 2015.

TOLOSA, Laia; DONATO, María Teresa; GÓMEZ-LECHÓN, María José. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. In: **Protocols in In Vitro Hepatocyte Research**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 333-348.

WAKSMAN, Selman A. What is an antibiotic or an antibiotic substance?. **Mycologia**, v. 39, n. 5, p. 565-569, 1947.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The top 10 causes of death. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 10/06/2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 10/06/2019.

ZAFFIRI, Lorenzo; GARDNER, Jared; TOLEDO-PEREYRA, Luis H. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. **Journal of Investigative Surgery**, v. 25, n. 2, p. 67-77, 2012.

ZAFFIRI, Lorenzo; GARDNER, Jared; TOLEDO-PEREYRA, Luis H. History of antibiotics: from fluoroquinolones to daptomycin (Part 2). **Journal of Investigative Surgery**, v. 26, n. 4, p. 167-179, 2013.

ZANATTA, Cinthia Fernanda et al. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2776-2781, 2008.

ZANATTA, C. F. et al. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 1, p. 70-75, 2010.